



INTERNATIONALES BÜRO
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C07K 14/635, 16/24, G01N 33/78		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/10041
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. April 1996 (04.04.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/03757 (22) Internationales Anmeldedatum: 22. September 1995 (22.09.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 34 551.8 28. September 1994 (28.09.94) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Niedersächsisches Institut für Peptidforschung, Feodor-Lynen-Strasse 31, D-30625 Hannover (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ADERMANN, Knut [DE/DE]; Schleidenstrasse 5, D-30177 Hannover (DE). HOCK, Dieter [DE/DE]; Weinbergstrasse 14, D-74924 Neckarsbischofsheim (DE). MÄGERLEIN, Markus [DE/DE]; Blumenstrasse 5, D-63785 Oberrambach (DE). (74) Anwalt: GODEMEYER, Thomas; Hauptstrasse 58, D-51491 Overath (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: PEPTIDES FROM THE hPTH SEQUENCE (1-37) (54) Bezeichnung: PEPTIDE AUS DER SEQUENZ DES hPTH (1-37) (57) Abstract <p>The invention concerns peptides from the human parathyroid hormone (hPTH) sequence (1-37) and containing α-helical amino acid sequence regions and/or non-structured amino acid sequence regions. The said peptides are capable of inducing antibodies when injected into animals. The invention also concerns a diagnostic agent and antibodies obtainable by vaccination of animals with the peptides in question.</p> (57) Zusammenfassung <p>Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37) enthaltend α-helicale Aminosäuresequenzbereiche und/oder nicht strukturierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die Peptide bei Injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind ein Diagnostikum und Antikörper erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den erfindungsgemäßen Peptiden.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37)

Die vorliegende Erfindung betrifft Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37), ein Diagnostikum erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den Peptiden, Antikörper oder deren Fragmente erhältlich durch Immunisierung von Tieren mit den Peptiden sowie die Verwendung der Peptide zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktivem h-PTH.

Humanes Parathormon (hPTH), ein lineares Polypeptid aus 84 Aminosäuren, spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Calciumstoffwechsels. Der Metabolismus dieses Hormons führt zu einer großen Zahl C-terminaler Fragmente, deren biologische Funktion noch nicht geklärt ist. Als zirkulierendes N-terminales Fragment ist das hPTH 1-37 festgelegt (EP-A 0 349 545). Dieses Fragment besitzt die volle biologische Aktivität des Gesamthormons. Diese nimmt allerdings bei Verlust der ersten Aminosäure, Serin, deutlich ab und geht ohne die ersten beiden Aminosäuren, Serin und Valin, völlig verloren.

Für das intakte Hormon hPTH 1-84 und für das N-terminale Fragment werden Serumkonzentrationen im Bereich von 10^{-12} mol/l gemessen. Zur Bestimmung solch niedriger Konzentrationen bedient man sich immunologischer Meßverfahren. Die validesten Ergebnisse liefern hierbei Meßverfahren nach dem Doppelantikörper oder Sandwich Prinzip (z.B. Two-site Radioimmuno-metric Assay, IRMA oder Sandwich Enzym Linked Immuno Sorbent Assay, Sandwich ELISA). Solche Assays sind für hPTH 1-84 kommerziell erhältlich. Zur Messung von hPTH 1-34 ist ein Assay nach dem Doppelantikörper-Prinzip nicht bekannt.

Hierfür sind zwei Antikörper notwendig. Diese müssen, um eine gegenseitige sterische Hinderung zu vermeiden, Epitope des Antigens erkennen, die in ausreichender Entfernung zueinander liegen. Bei Immunisierung mit dem intakten Antigen erhält man ein heterogenes Gemisch unterschiedlicher Anti-

- 2 -

- körper, die für einen Sandwich-Assay erst aufwendig gereinigt werden müssen. Zwar war es bisher möglich aufgrund theoretischer Berechnungen nach B.A. Jameson & H. Wolf, The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants, CABIOS 4, p 181-186, 1988 am N-Terminus eine bevorzugte immunogen wirkende Sequenz im Bereich der Aminosäuren 7 - 14 festzustellen. Eine Immunisierung mit N-terminalen Fragmenten nach etablierten Methoden führt in erster Linie zu Antikörpern, die, wie für hPTH 1-34 beschrieben (J. Tampe, P. Brozio, H.E. Manneck, A. Mißbichler, E. Blind, K.B. Müller, H. Schmidt-Gayk und F.P. Armbruster; Characterisation of antibodies against human N-terminal parathyroid hormon by epitope mapping; J. Immunoassay 13 S. 1-13, 1992), in dem Bereich dieser Aminosäuren binden. Diese Antikörper können aber nicht zwischen biologisch aktiven und biologisch inaktiven PTH 1-84 oder Fragmenten davon, denen die ersten beiden Aminosäuren Serin und Valin fehlen, unterscheiden.
- 20 Das der Erfindung zugrunde liegende technische Problem besteht darin, Peptide anzugeben, mit deren Hilfe die oben genannten Nachteile der Diagnose von biologisch aktivem h-PTH beseitigt werden können.
- 25 Das angesprochene technische Problem wird überraschenderweise gelöst durch Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37) enthaltend α -helicale Aminosäuresequenzbereiche und/oder nicht strukturierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die Peptide bei Injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen. Dabei enthalten die Peptide vorzugsweise die N-terminale α -Helix im Bereich der Aminosäuren 5-9, einen unstrukturierten Abschnitt der Aminosäuren 10-16 und/oder eine C-terminale α -Helix im Bereich der Aminosäuresequenz 17-34 des hPTH (1-37). Vorzugsweise werden die folgenden erfindungsgemäßen Peptide zur Immunisierung verwendet:
- 35

- 3 -

- hPTH 1-10
NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-Asn¹⁰-OH (1)
- hPTH 1-9
5 NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-OH (2)
- hPTH 1-8
NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-OH (3)
- 10 hPTH 1-7
NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-OH (4)
- hPTH 1-6
NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-OH (5)
- 15 hPTH 1-5
NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-OH (6)
- hPTH 9-18
20 NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (7)
- hPTH 10-18
NH₂-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (8)
- 25 hPTH 11-18
NH₂-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (9)
- hPTH 12-18
NH₂-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (10)
- 30 hPTH 13-18
NH₂-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (11)
- hPTH 14-18
35 NH₂-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (12)

- 4 -

hPTH 9-17

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-OH (13)

hPTH 9-16

5 NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-OH (14)

hPTH 9-15

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-OH (15)

10 hPTH 9-14

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-OH (16)

hPTH 9-13

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-OH (17)

15 hPTH 24-37

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-
Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (18)

hPTH 25-37

20 NH₂-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-
Ala³⁶-Leu³⁷-OH (19)

hPTH 26-37

25 NH₂-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-
Leu³⁷-OH (20)

hPTH 27-37

NH₂-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (21)

30

hPTH 28-37

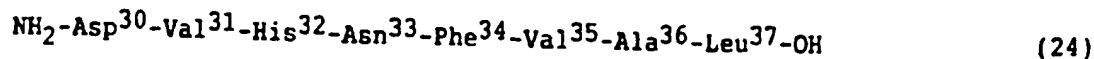
NH₂-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (22)

hPTH 29-37

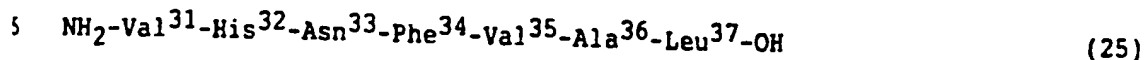
35 NH₂-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (23)

- 5 -

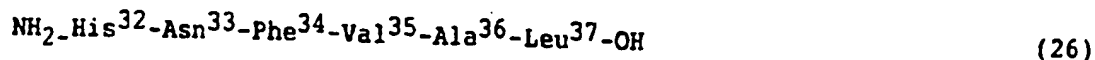
hPTH 30-37



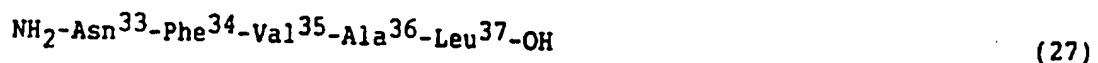
hPTH 31-37



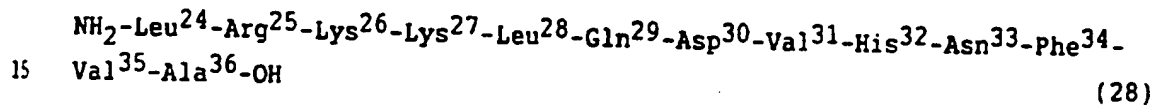
hPTH 32-37



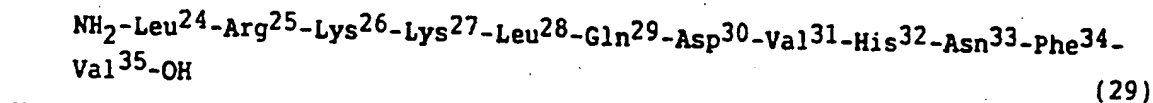
10 hPTH 33-37



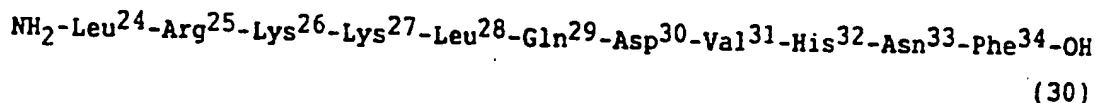
hPTH 24-36



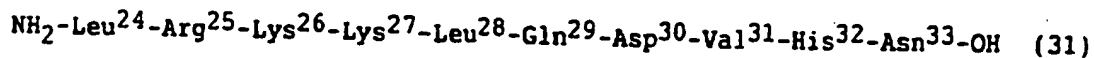
hPTH 24-35



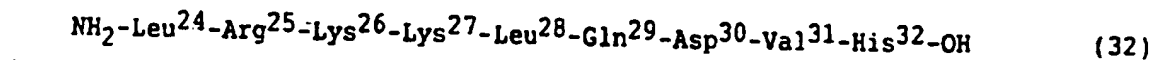
hPTH 24-34



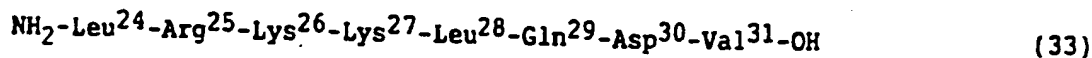
25 hPTH 24-33



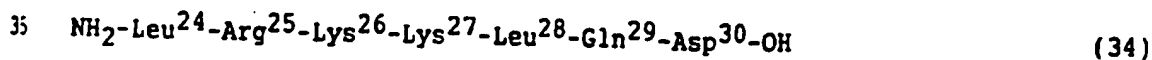
hPTH 24-32



hPTH 24-31

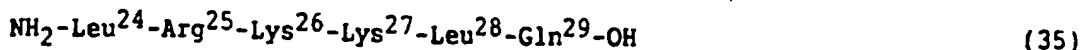


hPTH 24-30

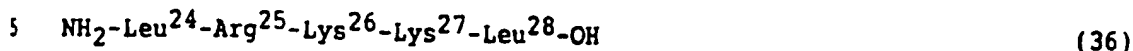


- 6 -

hPTH 24-29



hPTH 24-28



Die genannten Sequenzen repräsentieren in ihrer Primärstruktur wesentliche Merkmale der Sekundärstruktur, wie sich durch NMR-Daten unterstützend belegen läßt. Voraussetzung dazu war eine Festlegung der Sekundärstruktur für PTH 1-37 in physiologischer Lösung.

Die genannten strukturell auffälligen Bereiche wirken gut immunogen. Es werden Antikörper gebildet, die an den ersten Aminosäuren des N-Terminus binden. Bereits das Fehlen von zwei Aminosäuren führt zu einem erheblichen Affinitätsverlust. Da diese Aminosäuren zur Ausübung der biologischen Wirkung unerlässlich sind, ist es mit dem erfindungsgemäßen Peptid möglich Antikörper zu erhalten, die nur hPTH und Fragmente davon erkennen, die biologisch aktiv sind.

Weiterhin sind Antikörper herstellbar, die den midregionalen Bereich 9-15 detektieren, und Antikörper, die C-terminal im Bereich der Aminosäuren 30-37 binden. Erfindungsgemäß können also Antikörper gegen Bereiche des hPTH 1-37 produziert werden, die aufgrund theoretischer Berechnungen im Gesamtmolekül nicht immunogen wirken. Diese Bereiche liegen zudem so weit auseinander, daß keine sterische Hinderung vorliegt, die ein gleichzeitiges Binden zweier Antikörper verhindern würde.

Die Peptide können in bevorzugten Ausführungsformen am N-terminalen Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen Ende modifiziert sein, und zwar in Form von Acetylierungs-, Amidierungs-, Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungsprodukten.

- 7 -

Schließlich können erfindungsgemäße Peptide auch an Carrierproteine wie Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalalbumin oder Mausserumalbumin etc. gebunden sein. Die Bindung an die Carrierproteine erfolgt vorzugsweise durch
5 Carbodiimid oder Formaldehyd.

Die erfindungsgemäßen Peptide können verwendet werden, um ein Diagnostikum herzustellen. Das erfindungsgemäße Diagnostikum ist dabei erhältlich durch an sich bekannte Immunisierung von Tieren mit mindestens einem der erfindungsgemäßen Peptide. Nach der Immunisierung kann aus den immunisierten Tieren eine Immunglobulin-Fraktion isoliert werden, die Antikörper-Fraktionen enthält, welche einen Antikörper-Titer gegen mindestens eines der erfindungsgemäßen Peptide auf-
10 weisen. Die so erhaltenen Antikörpern sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. In einer alternativen Ausführungsform können neben den vollständigen Antikörpern bestehend aus F_{ab} und F_c auch deren Fragmente wie F_{ab} oder Fragmente der Antikörper verwendet werden, welche die Idiotypen zu den Epitopen der Peptide sind.
15 20

Die Peptide gemäß der Erfindung sind zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose von biologisch aktiven h-PTH (1-37) geeignet.
25

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher beschrieben:

Beispiel 1

30

Festphasensynthese der Peptide:

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Synthese der Peptide beruht auf der Peptidsynthese am festen Träger. Die C-terminale Aminosäure wird jeweils in Gegenwart von Dicyclohexylcarbodiimid und Dimethylaminopyridin an das Trägermaterial gebunden. Als Trägermaterial für die Synthesen werden Wang-
35

- 8 -

Harz oder entsprechende Harze eingesetzt.

Folgende L-Aminosäure-Derivate werden für die Synthese der Sequenz, ausgehend vom aufgeführten Peptidyl-Harz, verwendet: a) hPTH 1-10: Fmoc-Asn(Trt)-Wang-Harz, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Boc-Ser(tBu)-OH. b) hPTH 9-18: Fmoc-Met-Wang-Harz, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Boc-His(Trt)-OH. c) hPTH 24-37: Fmoc-Leu-Wang-Harz, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Leu-OH.

Die Synthese kann durch in situ-Aktivierung mit 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluroniumtetrafluoroborat (TBTU) oder dessen Derivaten oder mit Benzotriazol-1-yl-oxytris-(dimethylamino)-phosphoniumhexafluorophosphat (BOP) oder dessen Derivaten in Gegenwart von Diisopropylethylamin oder N-Methylmorpholin und 1-Hydroxybenzotriazol durchgeführt werden, wobei während der Kupplungen in N,N-Dimethylformamid, N,N-Dimethylacetamid oder N-Methylpyrrolidon ein vier- bis zehnfacher Überschuß der Fmoc-L-Aminosäure verwendet wird. Die Abspaltungen der Fmoc-Gruppen werden mit 20% Piperidin oder 2% Piperidin und 2% 1,8-Diazbicyclo[5,4,0]undec-7-en (DBU) in N,N-Dimethylformamid, N,N-Dimethylacetamid oder N-Methylpyrrolidon durchgeführt. Nach der Synthese werden die Harze mit 2-Propanol und Dichlormethan gewaschen und im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Zur Abspaltung vom Träger und Entblockierung wird das Peptidyl-Harz 30-90 Minuten bei Raumtemperatur mit Trifluoressigsäure, die 5% Scavenger, Wasser, Ethandiol, Phenol oder Thioanisol, enthält, umgesetzt, filtriert, mit Trifluoressigsäure gewaschen und anschließend mit tert-Butylmethylet-

- 9 -

her ausgefällt. Der Niederschlag wird aus wäßriger Lösung lyophilisiert.

5

Beispiel 2

Reinigung und Analyse

10 Die Reinigung der Rohprodukte erfolgt chromatographisch über eine C18-Reverse-Phase-Säule (10µm, Puffer A: 0,01 N HCl in Wasser; Puffer B: 20% Isopropanol, 30 % Methanol, 50% Wasser, 0,01 N HCl; Gradient: 10-80% in 60 Minuten; Detektion 230 nm).

15

Die Reinheit der Produkte wird durch Massenspektrometrie und C18-Reverse-Phase-Chromatographie bestimmt.

20 Beispiel 3

Kopplung an Carrierprotein

Als Carrierprotein werden Hämocyanin, Thyroglobulin, Rinder-
25 serumalbumin, Ovalbumin oder Mausserumalbumin verwendet. Die Kopplung erfolgt nach der Carbodiimid-Methode über Carboxylgruppen des Peptides. Das Peptid wird in wässriger Lösung durch 5 minütige Umsetzung mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimid-Hydrochlorid aktiviert. Die Kopplung
30 erfolgt durch Zugabe des aktivierten Peptides zu einer wässrigen Lösung des Carriers. Das molare Verhältnis beträgt 1 Peptid auf 50 Aminosäuren des Carrierproteins. Die Umsetzung dauert 4 Stunden.

Die Reaktion wird durch Zugabe von Natriumacetat in einer
35 Endkonzentration von 100 mM gestoppt. Man läßt eine Stunde inkubieren.

- 10 -

Die Abtrennung des Protein-Peptid Konjugates vom Peptid erfolgt durch wiederholte Dialyse gegen 100 mM Phosphatpuffer pH 7,2.

5

Beispiel 4

Synthese der Multiple Antigenic Peptides (MAP)

- 10 Die dreifache Lysin-Verzweigung wird erreicht, indem an C-terminales Alanin , gebunden an Wang-Harz, in drei Kupplungszyklen jeweils Fmoc-L-Lysin(Fmoc)-OH gebunden wird. Durch Abspaltung mit Piperidin werden danach acht freie Aminofunktionen erhalten, an denen die Sequenzen des humanen
- 15 Parathormons nach obiger Beschreibung synthetisiert werden.

Beispiel 5

20 Immunisierung

- Für die Erstimmunisierung werden pro kg Körpergewicht des zu immunisierenden Tieres 125 µg des Carrier-Peptid Konjugates bzw. MAP in 250 ml Wasser gelöst und mit 250 µl kompletten
- 25 Freund'schen Adjuvans emulgiert. Die Emulsion wird über den Rücken verteilt in 10 Portionen s.c. appliziert.

- Das Boostern erfolgt nach 2-4 Wochen analog. Hierbei wird lediglich das komplette Freund'sche Adjuvans durch inkomplettes Freund'sches Adjuvans ersetzt.
- 30

P a t e n t a n s p r ü c h e

- 5 1. Peptide aus der Sequenz des hPTH (1-37) enthaltend α -helicale Aminosäuresequenzbereiche und/oder nicht strukturierte Aminosäuresequenzbereiche, wobei die Peptide bei Injektion in Tiere Antikörper zu induzieren vermögen.
- 10 2. Peptide nach Anspruch 1 aus hPTH (1-37) mit der Sequenz
- hPTH 1-10
 $\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-Met}^8\text{-His}^9\text{-Asn}^{10}\text{-OH}$ (1)
- 15 hPTH 1-9
 $\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-Met}^8\text{-His}^9\text{-OH}$ (2)
- hPTH 1-8
 $\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-Met}^8\text{-OH}$ (3)
- 20 hPTH 1-7
 $\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-Leu}^7\text{-OH}$ (4)
- hPTH 1-6
25 $\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-Gln}^6\text{-OH}$ (5)
- hPTH 1-5
 $\text{NH}_2\text{-Ser}^1\text{-Val}^2\text{-Ser}^3\text{-Glu}^4\text{-Ile}^5\text{-OH}$ (6)
- 30 hPTH 9-18
 $\text{NH}_2\text{-His}^9\text{-Asn}^{10}\text{-Leu}^{11}\text{-Gly}^{12}\text{-Lys}^{13}\text{-His}^{14}\text{-Leu}^{15}\text{-Asn}^{16}\text{-Ser}^{17}\text{-Met}^{18}\text{-OH}$ (7)
- 35

- 12 -

hPTH 10-18

NH₂-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (8)

hPTH 11-18

5 NH₂-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (9)

hPTH 12-18

NH₂-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (10)

10 hPTH 13-18

NH₂-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (11)

hPTH 14-18

15 NH₂-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (12)

hPTH 9-17

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-OH (13)

hPTH 9-16

20 NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-OH (14)

hPTH 9-15

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-OH (15)

25 hPTH 9-14

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-OH (16)

hPTH 9-13

30 NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-OH (17)

hPTH 24-37

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (18)

35

- 13 -

hPTH 25-37

NH₂-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-
Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (19)

5 hPTH 26-37

NH₂-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-
Ala³⁶-Leu³⁷-OH (20)

hPTH 27-37

10 NH₂-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-
Leu³⁷-OH (21)

hPTH 28-37

15 NH₂-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-
OH (22)

hPTH 29-37

NH₂-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (23)

20 hPTH 30-37

NH₂-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (24)

hPTH 31-37

25 NH₂-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (25)

hPTH 32-37

NH₂-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (26)

hPTH 33-37

30 NH₂-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (27)

hPTH 24-36

35 NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-OH (28)

- 14 -

hPTH 24-35

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-Val³⁵-OH (29)

5

hPTH 24-34

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-OH (30)

10

hPTH 24-33

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
OH (31)

hPTH 24-32

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-OH (32)

15

hPTH 24-31

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-OH (33)

20

hPTH 24-30

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-OH (34)

hPTH 24-29

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-OH (35)

25

hPTH 24-28

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-OH (36)

3. Peptide nach Anspruch 1 und/oder 2, die am N-terminalen
Ende, in der Seitenkette und/oder am C-terminalen Ende
modifiziert sind in Form von Acetylierungs-, Amidierungs-,
Phosphorylierungs- und/oder Glycosylierungsprodukten,
und/oder gebunden sind an Carrierproteine wie Hämocyanin,
Thyroglobulin, Rinderserumalbumin, Ovalalbumin oder Maus-
serumalbumin.

35

- 15 -

4. Diagnostikum, erhältlich durch an sich bekannte Immuni-
sierung von Tieren mit mindestens einem der Peptide gemäß
5 mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, Gewinnung von
Immunoglobulinen enthaltenden Fraktionen aus den immuni-
sierten Tieren und Isolierung von Fraktionen, die einen
Antikörper-Titer gegen mindestens eines der Peptide gemäß
mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3 aufweisen und das
10 gegebenenfalls weiter Hilfs- und/oder Trägerstoffe ent-
hält.
5. Antikörper oder Fragmente von Antikörpern erhältlich
durch Immunisierung von Tieren mit mindestens einem Pep-
15 tid nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3.
6. Verwendung der Peptide gemäß mindestens einem der Ansprü-
che 1 bis 3 zur Herstellung eines Mittels zur Diagnose
von biologisch aktiven h-PTH (1-37).

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/EP 95/03757

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C07K14/635 C07K16/24 G01N33/78

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,94 03201 (HILLIKER SANDRA R) 17 February 1994 see claims; example 1 ---	1,2
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 21, 24 May 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 174594, NAKAMURA, RYUICHI ET AL 'Action of fragments of human parathyroid hormone on blood pressure in rats' see abstract & ENDOCRINOL. JPN. (1981), 28(4), 547-9 CODEN: ECJPAE; ISSN: 0013-7219, 1981 ----- -/--	1,2

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 January 1996

Date of mailing of the international search report

26. 01. 96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 95/03757

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 5, 1 February 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 29060, NUSSBAUM, SAMUEL R. ET AL 'Monoclonal antibodies directed against the biologically active region of parathyroid hormone' see abstract & MONOCLONAL ANTIBODIES ENDOCR. RES. (1981), 181-92. EDITOR(S): FELLOWS, ROBERT E.; EISENBARTH, GEORGE S. PUBLISHER: RAVEN, NEW YORK, N. Y. CODEN: 46PAAZ, 1981	1,2,4-6
X	--- JOURNAL OF IMMUNOASSAY, vol. 13, no. 1, 1992 NEW YORK, US, pages 1-13, J. TAMPE ET AL. 'Characterization of Antibodies against Human N-Terminal Parathyroid Hormone by Epitope Mapping' cited in the application see page 2, paragraph 2 see page 4, paragraph 1 see results and discussion of the pages 5-12;	1-6
X	--- J. PHARMACOL. EXP. THER. (1981), 216(3), 567-71 CODEN: JPETAB; ISSN: 0022-3565, 1981 PANG, PETER K. T. ET AL 'Hypotensive action of synthetic fragments of parathyroid hormone' see page 567, right column, paragraph 2 see page 568, right column, paragraph 5; figure 1; table 1	1,2
X	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 17, 26 October 1981 Columbus, Ohio, US; abstract no. 144316, HASHIMOTO, KEITARO ET AL 'Effects of parathyroid hormone and related polypeptides on the heart and coronary circulation of dogs' see abstract & J. CARDIOVASC. PHARMACOL. (1981), 3(4), 668-76 CODEN: JCPCDT; ISSN: 0160-2446, 1981	1,2
X	--- FR, A, 2 550 204 (TOYO JOZO KK) 8 February 1985 see fragment 10 of page 25 and fragment 40 of page 50. -/--	1-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 95/03757

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	E. Wingender et al. 'Structure-Function Relationship in Parathyroid Hormone' in: Advances in Protein Design, International Workshop 1988, GBF Monographs, Vol. 12, ed. by H. Blöcker, J. Collins, R.D. Schmid, D. Schomburg; pub. by VCH, 1988, p. 167-176, see page 169, paragraph 3 ---	1
X	ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, vol. 208, 1986 NEW YORK, US, pages 315-327, L.H. CAPOREALE AND M. ROSENBLATT 'Parathyroid Hormone Antagonists effective in vivo' see figure 1 ---	1
X	WO,A,91 06564 (FORSSMANN WOLF GEORG) 16 May 1991 see page 5, paragraph 3; claims 1-5,14 ---	1,3-6
A	DE,A,33 47 548 (JUEPPNER HARALD WERNER DR MED;HESCH ROLF DIETER) 11 July 1985 see claims; examples -----	1,4-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 95/03757

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9403201	17-02-94	CA-A- 2141588 EP-A- 0656784	17-02-94 14-06-95
FR-A-2550204	08-02-85	JP-C- 1684818 JP-B- 3052479 JP-A- 60034996 JP-A- 61024598 DE-A- 3428942 US-A- 4656250	31-07-92 12-08-91 22-02-85 03-02-86 28-02-85 07-04-87
WO-A-9106564	16-05-91	DE-A- 3935738 AT-T- 121424 AU-B- 643725 AU-B- 6871291 CA-A- 2071538 DE-D- 59008949 EP-A- 0497915 ES-T- 2071837	08-05-91 15-05-95 25-11-93 31-05-91 28-04-91 24-05-95 12-08-92 01-07-95
DE-A-3347548	11-07-85	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/03757

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 C07K14/635 C07K16/24 G01N33/78

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 6 C07K G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,94 03201 (HILLIKER SANDRA R) 17. Februar 1994 siehe Ansprüche; Beispiel 1 ---	1,2
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 21, 24. Mai 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 174594, NAKAMURA, RYUICHI ET AL 'Action of fragments of human parathyroid hormone on blood pressure in rats' siehe Zusammenfassung & ENDOCRINOL. JPN. (1981), 28(4), 547-9 CODEN: ECJPAE; ISSN: 0013-7219, 1981 --- -/-	1,2

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

A Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. Januar 1996

Abmeldedatum des internationalen Recherchenberichts

26.01.96

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Fuhr, C

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 96, no. 5, 1.Februar 1982 Columbus, Ohio, US; abstract no. 29060, NUSSBAUM, SAMUEL R. ET AL 'Monoclonal antibodies directed against the biologically active region of parathyroid hormone' siehe Zusammenfassung & MONOCLONAL ANTIBODIES ENDOCR. RES. (1981), 181-92. EDITOR(S): FELLOWS, ROBERT E.; EISENBARTH, GEORGE S. PUBLISHER: RAVEN, NEW YORK, N. Y. CODEN: 46PAAZ, 1981 ---	1,2,4-6
X	JOURNAL OF IMMUNOASSAY, Bd. 13, Nr. 1, 1992 NEW YORK, US, Seiten 1-13, J. TAMPE ET AL. 'Characterization of Antibodies against Human N-Terminal Parathyroid Hormone by Epitope Mapping' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 2, Absatz 2 siehe Seite 4, Absatz 1 siehe 'results' und 'discussion' auf den Seiten 5-12 ---	1-6
X	J. PHARMACOL. EXP. THER. (1981), 216(3), 567-71 CODEN: JPETAB; ISSN: 0022-3565, 1981 PANG, PETER K. T. ET AL 'Hypotensive action of synthetic fragments of parathyroid hormone' siehe Seite 567, rechte Spalte, Absatz 2 siehe Seite 568, rechte Spalte, Absatz 5; Abbildung 1; Tabelle 1 ---	1,2
X	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 95, no. 17, 26.Oktober 1981 Columbus, Ohio, US; abstract no. 144316, HASHIMOTO, KEITARO ET AL 'Effects of parathyroid hormone and related polypeptides on the heart and coronary circulation of dogs' siehe Zusammenfassung & J. CARDIOVASC. PHARMACOL. (1981), 3(4), 668-76 CODEN: JCPCDT; ISSN: 0160-2446, 1981 ---	1,2
X	FR,A,2 550 204 (TOYO JOZO KK) 8.Februar 1985 siehe Fragment 10 auf Seite 25 und Fragment 40 auf Seite 50 --- -/--	1-3

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	E. Wingender et al. 'Structure-Function Relationship in Parathyroid Hormone' in: Advances in Protein Design, International Workshop 1988, GBF Monographs, Vol. 12, ed. by H. Blöcker, J. Collins, R.D. Schmid, D. Schomburg; pub. by VCH, 1988, p. 167-176, siehe Seite 169, Absatz 3 ---	1
X	ADVANCES IN EXPERIMENTAL MEDICINE AND BIOLOGY, Bd. 208, 1986 NEW YORK, US, Seiten 315-327, L.H. CAPORALE AND M. ROSENBLATT 'Parathyroid Hormone Antagonists effective in vivo' siehe Abbildung 1 ---	1
X	WO,A,91 06564 (FORSSMANN WOLF GEORG) 16.Mai 1991 siehe Seite 5, Absatz 3; Ansprüche 1-5,14 ---	1,3-6
A	DE,A,33 47 548 (JUEPPNER HARALD WERNER DR MED;HESCH ROLF DIETER) 11.Juli 1985 siehe Ansprüche; Beispiele -----	1,4-6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/03757

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9403201	17-02-94	CA-A- 2141588 EP-A- 0656784	17-02-94 14-06-95
FR-A-2550204	08-02-85	JP-C- 1684818 JP-B- 3052479 JP-A- 60034996 JP-A- 61024598 DE-A- 3428942 US-A- 4656250	31-07-92 12-08-91 22-02-85 03-02-86 28-02-85 07-04-87
WO-A-9106564	16-05-91	DE-A- 3935738 AT-T- 121424 AU-B- 643725 AU-B- 6871291 CA-A- 2071538 DE-D- 59008949 EP-A- 0497915 ES-T- 2071837	08-05-91 15-05-95 25-11-93 31-05-91 28-04-91 24-05-95 12-08-92 01-07-95
DE-A-3347548	11-07-85	KEINE	

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED BY REASON
OF THE PCT (PATENT COOPERATION TREATY)

(51) International Patent Classification⁶: C07K 14/635, 16/24, G01N 33/78	A1	(11) International Publication Number: WO 96/10041 (43) International Publication Date: April 4, 1996 (4/4/96)
(21) International Application Number: PCT/EP95/03757 (22) International Filing Date: September 22, 1995 (9/22/95) (30) Data on Priority: P 44 34 551.8 September 28, 1994 (9/28/94) DE (71) Applicant and Inventor: FORSSMANN, Wolf-Georg [DE/DE]; Niedersächsisches Institut für Peptidforschung, Feodor-Lynen-Strasse 31, D- 30625 Hannover (Germany). (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (US only): ADERMANN, Knut [DE/DE]; Schleidenstrasse 5, D-30177 Hannover (Germany). HOCK, Dieter [DE/DE]; Weinbergstrasse 14, D-74924 Neckarsbischofsheim (Germany). MAGERLEIN, Markus [DE/DE]; Blumenstrasse 5, D-63785 Obernburg (Germany). (74) Attorney: GODEMEYER, Thomas; Hauptstrasse 58, D- 51491 Overath (Germany).		(81) States Designated: JP, US, European Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Published <i>With international search report.</i> <i>Prior to expiration of the period set for amendment of the Claims, it will be republished if such amendments are received.</i>
(54) Title: PEPTIDES FROM THE hPTH SEQUENCE (1-37) (57) Abstract The invention concerns peptides from the human parathyroid (hPTH) sequence (1-37) and containing α -helical amino acid sequence regions and/or non-structured amino acid sequence regions. The said peptides are capable of inducing antibodies when injected into animals. The invention also concerns a diagnostic agent and antibodies obtainable by vaccination of animals with the peptides in question.		

SOLELY FOR INFORMATION

Codes used to identify PCT member States on cover pages of documents publishing international applications under PCT.

AT	Austria	GA	Gabon	MR	Mauritania
AU	Australia	GB	United Kingdom	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgia	NE	Niger
BE	Belgium	GN	Guinea	NL	Netherlands
BF	Burkina Faso	GR	Greece	NO	Norway
BG	Bulgaria	HU	Hungary	NZ	New Zealand
BJ	Benin	IE	Ireland	PL	Poland
BR	Brazil	IT	Italy	PT	Portugal
BY	Byelorussia	JP	Japan	RO	Romania
CA	Canada	KE	Kenya	RU	Russian Federation
CF	Central African Republic	KG	Kyrgyzstan	SD	Sudan
CG	Congo	KP	People's Democratic Republic	SE	Sweden
CH	Switzerland		of Korea	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	KR	Republic of Korea	SK	Slovakia
CM	Cameroon	KZ	Kazakhstan	SN	Senegal
CN	China	LI	Liechtenstein	TD	Chad
CS	Czechoslovakia	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CZ	Czech Republic	LU	Luxembourg	TJ	Tajikistan
DE	Germany	LV	Latvia	TT	Trinidad and Tobago
DK	Denmark	MC	Monaco	UA	Ukraine
ES	Spain	MD	Republic of Moldavia	US	United States of America
FI	Finland	MG	Madagascar	UZ	Uzbekistan
FR	France	ML	Mali	VN	Vietnam
		MN	Mongolia		

Peptides from the hPTH Sequence (1-37)

This invention relates to peptides from the hPTH sequence (1-37), a diagnostic agent obtainable by vaccination of animals with the peptides, antibodies or fragments thereof, that can be obtained by vaccination of animals with the peptides, as well as the use of peptides for production of an agent for diagnosis of biologically active h-PTH.

Human parathyroid hormone (hPTH), a linear polypeptide of 84 amino acids, plays an important role in regulating the calcium metabolism. The metabolism of this hormone leads to a large number of C-terminal fragments whose biological function has not been clarified yet. Human PTH 1-37 has been detected as a circulating N-terminal fragment (EP-A 0 349 545). This fragment possesses the full biological activity of the complete hormone. This decreases substantially, however, upon loss of the first amino acid, serine, and is completely lost upon removal of the first two amino acids, serine and valine.

For the intact hormone, hPTH 1-84, and for the N-terminal fragment, serum concentrations have been measured in the area of 10^{-12} mol/L. Immunological measurement techniques are used to detect such low concentrations. The most valid results are provided by the double-antibody or sandwich principle (e.g., two-site immunoradiometric assay (IRMA), or Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Sandwich ELISA)). These assays for hPTH 1-84 are available commercially. There is no assay for hPTH 1034 using the double antibody principle.

Two antibodies are required for this. To avoid reciprocal steric hindrance, the method must recognize epitopes of the antigen located at a sufficient distance from each other. Vaccination with intact antigens results in a heterogeneous mixture of

various antibodies that have to be purified before the sandwich assay. Of course, detecting a preferred immunoactive sequence in the region of amino acids 7-14 at the N terminus was possible previously based on theoretical calculations according to B.A. Jameson & H. Wolf, "The Antigenic Index: A Novel Algorithm for Predicting Antigenic Determinants", CABIOS 4, pp. 181-186, 1988. Vaccination with N-terminal fragments according to established methods leads, initially, to antibodies that bind in this amino acid region, as described for hPTH 1-34 (J. Tampe, P. Brozio, H.E. Manneck, A. Mißbichler, E. Blind, K.B. Müller, H. Schmidt-Gayk and F.P. Armbruster; "Characterization of Antibodies Against Human N-Terminal Parathyroid Hormone by Epitope Mapping"; J. Immunoassay 13, pp. 1-13, 1992). However, these antibodies cannot distinguish between biologically-active and biologically-inactive PTH 1-84 or fragments thereof missing the first two amino acids, serine and valine.

The problem to which the invention relates consists of specifying peptides that can help to eliminate the above disadvantages in diagnosing biologically-active h-PTH.

The technical problem discussed is solved surprisingly by peptides from the hPTH sequence (1-37) containing α -helical amino acid sequence regions and/or unstructured amino acid sequence regions, where vaccination of animals with the peptides can induce antibodies. The peptides here preferably contain the N terminal α helix in the region of amino acids 5-9, an unstructured section of amino acids 10-16 and/or a C terminal α helix in the region of amino acid sequence 17-34 of the hPTH (1-37). The following peptides according to the invention are preferably used for the vaccination:

- hPTH 1-10
NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-Asn¹⁰-OH (1)
- hPTH 1-9
NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-His⁹-OH (2)
- hPTH 1-8
NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-Met⁸-OH (3)
- hPTH 1-7
NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-Leu⁷-OH (4)
- hPTH 1-6
NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-Gln⁶-OH (5)
- hPTH 1-5
NH₂-Ser¹-Val²-Ser³-Glu⁴-Ile⁵-OH (6)
- hPTH 9-18
NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (7)
- hPTH 10-18
NH₂-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (8)
- hPTH 11-18
NH₂-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (9)
- hPTH 12-18
NH₂-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (10)
- hPTH 13-18
NH₂-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (11)
- hPTH 14-18
NH₂-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (12)

hPTH 9-17

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-OH (13)

hPTH 9-16

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-OH (14)

hPTH 9-15

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-OH (15)

hPTH 9-14

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-OH (16)

hPTH 9-13

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-OH (17)

hPTH 24-37

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (18)

hPTH 25-37

NH₂-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (19)

hPTH 26-37

NH₂-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (20)

hPTH 27-37

NH₂-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (21)

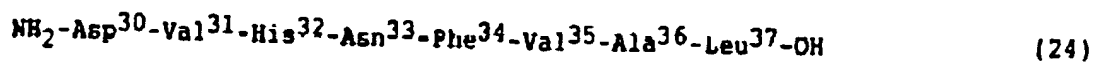
hPTH 28-37

NH₂-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (22)

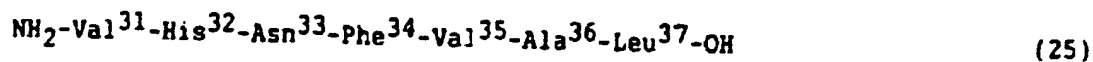
hPTH 29-37

NH₂-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (23)

hPTH 30-37



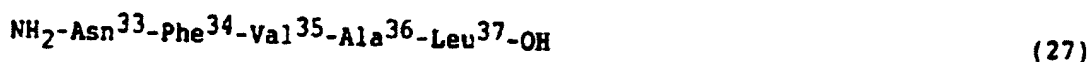
hPTH 31-37



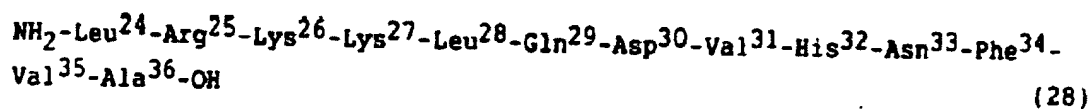
hPTH 32-37



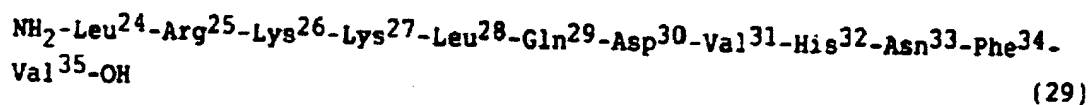
hPTH 33-37



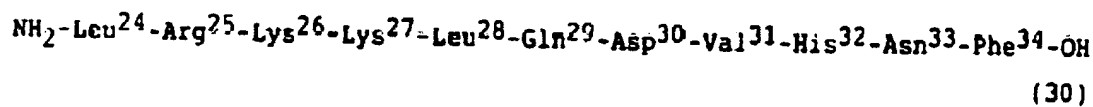
hPTH 24-36



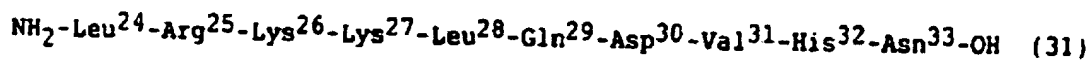
hPTH 24-35



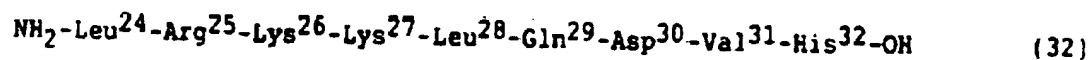
hPTH 24-34



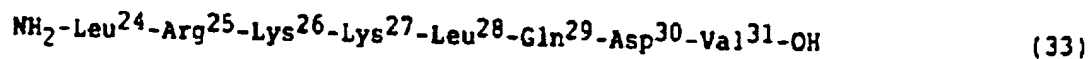
hPTH 24-33



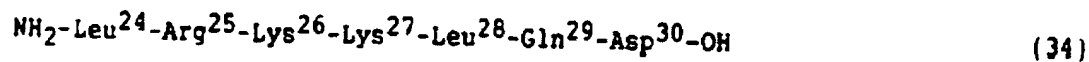
hPTH 24-32

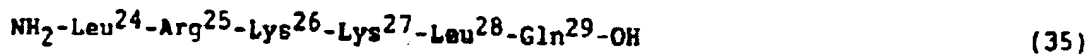


hPTH 24-31



hPTH 24-30



hPTH 24-29**hPTH 24-28**

The primary structures of the above sequences represent essential characteristics of the secondary structure, as supported by the NMR data. A precondition for this was determining the secondary structure of PTH 1-37 in saline solution.

The structurally-remarkable regions cited have good immunogenic activity. Antibodies are formed that bind to the first amino acids of the N terminus. The lack of two amino acids already leads to a substantial loss of affinity. Since these amino acids are essential to biological activity, it is possible to obtain antibodies with the peptides according to the invention that recognize only hPTH and fragments thereof that are biologically active.

Furthermore, antibodies can be produced that detect the mid-region areas 9-15, and antibodies that bind in the region of amino acids 30-37. According to the invention, therefore, antibodies can be produced against regions of hPTH 1-37 that do not have immunogenic effects based on theoretical calculations in the intact molecule. These regions are also located at such a distance from each other that there is no steric hindrance that would hinder the simultaneous binding of two antibodies.

In the preferred embodiment, the peptides can be modified at the N terminal end, the side chains and/or at the C terminal end, by acetylation, amidation, phosphorylation and/or glycosylation products.

Finally, peptides according to the invention can also be bound to carrier proteins such as hemocyanin, thyroglobulin, bovine serum albumin, ovalbumin or mouse serum albumin. They are preferably bound with the carrier protein through carbodiimide or formaldehyde.

The peptides according to the invention can be used to produce a diagnostic agent. The diagnostic agent according to the invention can be obtained by known vaccination of animals with at least one of the peptides according to the invention. After vaccination, an immunoglobulin fraction can be isolated from the vaccinated animals; the fraction contains antibody fractions that have an antibody titer against at least one of the peptides according to the invention. The antibodies thus obtained are also the subject of this invention. In an alternative embodiment, in addition to the complete antibodies consisting of F_{ab} and F_c , fragments thereof, such as F_{ab} , or fragments of antibodies are used; they are the idiotypes for the epitopes of the peptides.

The peptides according to the invention are suitable for production of an agent for diagnosing biologically-active h-PTH (1-37).

The invention is described in greater detail based on the following examples:

Example 1

Solid Phase Peptide Synthesis

The process for synthesis of peptides according to the invention is based on peptide synthesis on solid carriers. The C terminal amino acids are bound to the carrier material in the presence of

dicyclohexylcarbodiimide and dimethylaminopyridine. The carrier material used for the synthesis is Wang resin or similar resins.

The following L-amino acid derivatives are used for the synthesis of the sequence, starting with the specified peptidyl resin:

- a) hPTH 1-10: Fmoc-Asn(Trt)-Wang resin, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Boc-Ser(tBu)-OH.
- b) hPTH 9-18: Fmoc-Met-Wang resin, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Boc-His(Trt)-OH.
- c) hPTH 24-37: Fmoc-Leu-Wang resin, Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Arg(Pmc)-OH, Fmoc-Leu-OH.

The synthesis can be carried out through in-situ activation with 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU) or derivatives thereof, or with benzotriazol-1-yloxy-trisdimethylamino phosphonium hexafluorophosphate (BOP) or derivatives thereof in the presence of diisopropyl ethylamine or N-methylmorpholine and 1-hydroxybenzotriazole, where a four- to ten-fold excess of Fmoc-L-amino acid is used during the couplings in N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide or N-methylpyrrolidone. The Fmoc groups are dissociated with 20% piperidine or 2% piperidine and 2% 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU) in N,N-dimethylformamide, N,N-dimethylacetamide or N-methylpyrrolidone. After synthesis, the resin is washed with 2-propanol and dichloromethane and dried to a constant weight under a high vacuum.

For dissociation from the carrier and unblocking, the peptidyl resin is treated for 30 - 90 minutes at ambient temperature with trifluoroacetic acid containing 5% scavenger, water, ethanediol,

phenol or thioanisole, then filtered, washed with trifluoroacetic acid and finally precipitated with tert-butyl methyl ether. The precipitate is lyophilized out of an aqueous solution.

Example 2

Purification and Analysis

The raw product is purified by chromatography in a C-18 reverse phase column (10 μ m, Buffer A: 0.01 N HCl in water; Buffer B: 20% isopropanol, 30% methanol, 50% water, 0.01 N HCl; gradient: 10 - 80% in 60 minutes; detection 230 nm).

The purity of the product is determined by mass spectrometry and C18 reverse phase chromatography.

Example 3

Coupling to Carrier Protein

Hemocyanin, thyroglobulin, bovine serum albumin, ovalbumin or mouse serum albumin is used as a carrier protein. The coupling takes place according to the carbodiimide method, via the carboxyl groups of the peptide. The peptide is activated by a 5-minute treatment in an aqueous solution with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride. Coupling occurs by the addition of the activated peptide to an aqueous solution of the carrier. The molar ratio is 1 peptide to 50 amino acids of the carrier protein. The treatment takes 4 hours.

The reaction is stopped by addition of sodium acetate in a final concentration of 100 mM. Incubate for 1 hour.

The protein-peptide conjugate is separated from the peptide by repeated dialysis over 100 mM of phosphate buffer, pH 7.2

Example 4

Synthesis of Multiple Antigenic Peptides (MAP)

The triple lysine branch is achieved by binding Fmoc-L-lysine(Fmoc)-OH to C terminal alanine, bound to Wang resin, in three coupling cycles. Eight free amino functions are obtained by dissociation with piperidine; the sequences of human parathyroid hormone are synthesized at those functions according to the description above.

Example 5

Vaccination

125 µg of the carrier-peptide conjugate or MAP, dissolved in 250 ml water and emulsified with 250 µl of complete Freund's adjuvant, is used per kg of body weight for the first vaccination. The emulsion is applied to the back in 10 separate SC injections.

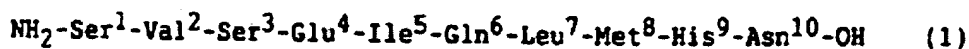
Boosters are given similarly after 2-4 weeks. However, the complete Freund's adjuvant is replaced with incomplete Freund's adjuvant here.

Patent Claims

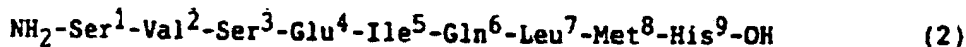
We claim:

1. A peptide from the hPTH sequence (1-37) containing α -helical amino acid sequence regions and/or unstructured amino acid sequence regions, wherein the peptides can induce antibodies upon injection into animals.
2. Peptides according to Claim 1, from hPTH (1-37), with the sequence:

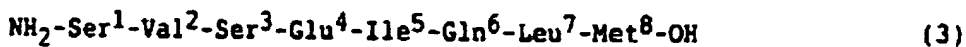
hPTH 1-10



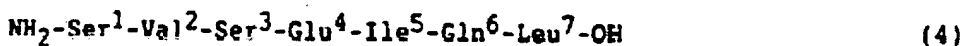
hPTH 1-9



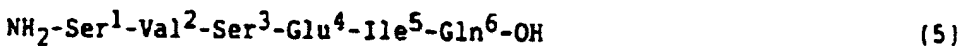
hPTH 1-8



hPTH 1-7



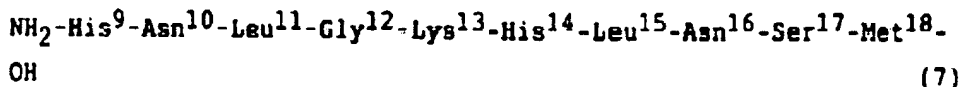
hPTH 1-6



hPTH 1-5



hPTH 9-18



hPTH 10-18

NH₂-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (8)

hPTH 11-18

NH₂-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (9)

hPTH 12-18

NH₂-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (10)

hPTH 13-18

NH₂-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (11)

hPTH 14-18

NH₂-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-Met¹⁸-OH (12)

hPTH 9-17

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-Ser¹⁷-OH (13)

hPTH 9-16

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-Asn¹⁶-OH (14)

hPTH 9-15

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-Leu¹⁵-OH (15)

hPTH 9-14

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-His¹⁴-OH (16)

hPTH 9-13

NH₂-His⁹-Asn¹⁰-Leu¹¹-Gly¹²-Lys¹³-OH (17)

hPTH 24-37

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (18)

hPTH 25-37

NH₂-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-
Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (19)

hPTH 26-37

NH₂-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-
Ala³⁶-Leu³⁷-OH (20)

hPTH 27-37

NH₂-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-
Leu³⁷-OH (21)

hPTH 28-37

NH₂-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-
OH (22)

hPTH 29-37

NH₂-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (23)

hPTH 30-37

NH₂-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (24)

hPTH 31-37

NH₂-Val³¹-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (25)

hPTH 32-37

NH₂-His³²-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (26)

hPTH 33-37

NH₂-Asn³³-Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-Leu³⁷-OH (27)

hPTH 24-36

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-Val³⁵-Ala³⁶-OH (28)

hPTH 24-35

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-Val³⁵-OH (29)

hPTH 24-34

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
Phe³⁴-OH (30)

hPTH 24-33

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-Asn³³-
OH (31)

hPTH 24-32

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-His³²-OH (32)

hPTH 24-31

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-Val³¹-OH (33)

hPTH 24-30

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-Asp³⁰-OH (34)

hPTH 24-29

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-Gln²⁹-OH (35)

hPTH 24-28

NH₂-Leu²⁴-Arg²⁵-Lys²⁶-Lys²⁷-Leu²⁸-OH (36)

3. Peptides according to Claim 1 and/or 2, modified at the N-terminal end, the side chains and/or the C-terminal end with acetylation, amidation, phosphorylation and/or glycosylation products, and/or bound to carrier proteins such as hemocyanin, thyroglobulin, bovine serum albumin, ovalbumin or mouse serum albumin.
4. A diagnostic agent obtainable by vaccination, known *per se*, of animals with at least one of the peptides according to at least one of the Claims 1 through 3, by obtaining fractions containing immunoglobulins from the vaccinated animals and by isolating fractions with an antibody titer against at least one of the peptides according to at least one of Claims 1 through 3 and that contains, if necessary, other adjuvants and/or carriers.
5. Antibody or fragments of antibodies obtained by vaccination of animals with at least one peptide according to at least one of Claims 1 through 3.
6. Use of the peptides according to at least one of Claims 1 through 3 for production of an agent for diagnosis of biologically-active h-PTH (1-37).

[International Search Report in English]

[International Search Report in German identical to English-language Search Report]